

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>4</sup> : B01D 15/00, G01N 33/50 B01L 3/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 09201</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Dezember 1988 (01.12.88)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP88/00442</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1988 (19.05.88)</p> <p>(31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 17 211.5</p> <p>(32) Prioritätsdatum: 22. Mai 1987 (22.05.87)</p> <p>(33) Prioritätsland: DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DIAGEN [DE/DE]; Institut für molecularbiologische Diagnostik GmbH , Niederheider Straße 3, D-4000 Düsseldorf (DE).</p> <p>(72) Erfinder;und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : COLPAN, Metin [TR/ DE]; Karschhauser Straße 18, D-4006 Erkrath 2 (DE). PIOTROWIAK, Ralf [DE/DE]; Weißdornweg 40, D- 4010 Hilden (DE).</p>	<p>(74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten usw.; Deichmann- haus, D-5000 Köln 1 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (eu- ropäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR SEPARATING AND CLEANING MOLECULES

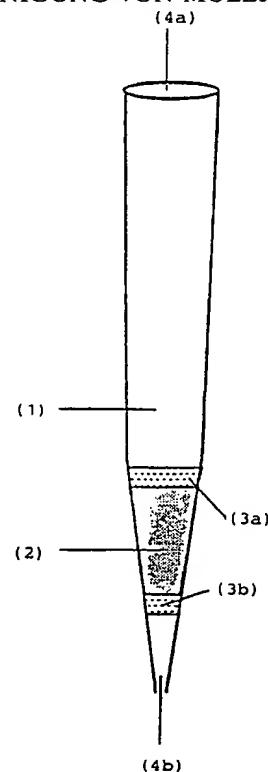
(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR TRENNUNG UND REINIGUNG VON MOLEKÜ-  
LEN

(57) Abstract

In a device for separating and cleaning molecules by adsorption of the molecules on a matrix (2), the solution is forced through the device. The matrix (2) is arranged, between two devices (3a, 3b) permeable to the solution, in a hollow frustum-shaped body (1) open at both ends (4a, 4b), the wider opening (4a) being connected, if necessary, to a cylindrical hollow body. The matrix (2) and the devices (3a, 3b) together occupy 5 to 50% of the volume of the hollow body and the wider opening (4a) of the hollow frustum-shaped body (1) can be connected to a pipette. The use of the device in a process for separating and cleaning molecules on a matrix is also described.

(57) Zusammenfassung

Zur Trennung und Reinigung von Molekülen durch Adsorption der Moleküle an eine Matrix (2) wird die Lösung durch eine Vorrichtung gedrückt, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die Matrix (2) in einem an beiden Enden (4a, 4b) offenen, kegelstumpfförmigen Hohlkörper (1), an den gegebenenfalls an der weiteren Öffnung (4a) ein zylindrischer Hohlkörper anschließt, zwischen zwei für die Lösung durchlässigen Einrichtungen (3a, 3b) angeordnet ist, wobei die Matrix (2) und die Einrichtungen (3a, 3b) zusammen 5 bis 50% des Hohlkörpervolumens ausfüllen und die weitere Öffnung (4a) des kegelstumpfförmigen Hohlkörpers (1) an eine Pipette anschließbar ist. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in einem Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen an einer Matrix wird ebenfalls beschrieben.



Vorrichtung und Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen

5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen aus einer Lösung durch Adsorption der Moleküle an eine in der Vorrichtung angeordneten Matrix.

10 Zur Probenaufbereitung in chemisch, biochemisch und molekularbiologisch orientierten Laboratorien werden Chromatographiematerialien unterschiedlichster Art seit langem in bewährter Weise verwendet. Häufig fallen dabei die Proben in Mikromaßstab an, insbesondere im biochemischen und molekularbiologischen, aber auch im analytisch-chemischen Laboratorium. Die chromatographischen Materialien werden auch zur Extraktion von bestimmten Bestandteilen aus den Proben eingesetzt. Die als Festphasenextraktion zu bezeichnende Verfahrensweise kann man sich auch zur Reinigung und Trennung von Substanzgemischen in Lösung zunutze machen. Bislang wurden neben den Chromatographiesäulen, insbesondere in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, auch Kartuschen, Einwegspritzen oder kleine Plastikchromatographiesäulen, die jeweils mit dem gewünschten Chromatographiematerial gefüllt sind, verwendet.

25 Diese Hilfsmittel, die im Niederdruckbereich Verwendung finden, zeichnen sich unvorteilhaft dadurch aus, daß sie nicht mit etablierten Laboratoriumsgerätschaften kompatibel sind. Ein weiterer Nachteil dieser Hilfsmittel besteht darin, daß sie nur eine Flußrichtung der die zu trennenden und reinigenden Moleküle enthaltenden Lösung zulassen. Man muß also bei der Verfahrensweise gemäß dem Stand der Technik die Probe zunächst in ein Vorratsgefäß, beispielsweise eine Einwegspritze, bringen, um sie dann durch das Flußmittel, insbesondere Kartuschen oder Extraktionssäulen, zu drücken.

5 Daher bedient man sich in der Praxis dieser Hilfsmittel  
überwiegend dann, wenn man die unerwünschten Produkte  
adsorbieren will. Ansonsten muß man das Vorratsgefäß,  
beispielsweise die Einwegspritze, entfernen, mit einem  
die adsorbierte Substanz eluierenden Lösung erneut be-  
schicken und anschließend durch das Hilfsmittel drücken,  
um die gewünschten Produkte zu erhalten. Durch das Ab-  
nehmen und Aufsetzen eines Vorratsgefäßes besteht je-  
10 doch eine Kontaminationsgefahr für den Mitarbeiter, die  
Umwelt und die Probe selbst. Die Gefahr besteht gerade  
im medizinisch-technischen Bereich, wenn beispielsweise  
mit infektiösem Material gearbeitet wird, oder auch in  
biochemisch-molekularbiologischen Laboratorien, wenn  
insbesondere mit radioaktiven Substanzen hantiert wird.

15 In der Praxis besteht ein erheblicher Bedarf an einer  
Vorrichtung, die es in einfacher Weise ermöglicht, ein  
Verfahren zur Reinigung und Trennung von Molekülen aus  
einer Lösung durchzuführen.

20 Aufgabe der Erfindung ist es also, eine Vorrichtung  
bereitzustellen, die es ermöglicht,

- Moleküle aus einer Lösung zu extrahieren,
- 25 - keine bevorzugte Extraktions- oder Elutionsrichtung  
zu verlangen,
- eine Abtrennung und Wiederhinzufügung eines Vorrats-  
gefäßes zu vermeiden,
- die Trennungs- und Reinigungsoperationen in einem  
geschlossenen System durchzuführen,
- 30 - die Kontaminationsgefahr für Personal, Umwelt und  
Probe zu vermeiden, und
- gleichzeitig die Arbeitsweise insgesamt zu erleich-  
tern.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Vor-  
richtung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die

- 3 -

Matrix 2 in einem an beiden Enden 4a, 4b offenen, kegelstumpfförmigen Hohlkörper 1, an den gegebenenfalls an der weiteren Öffnung 4a ein zylindrischer Hohlkörper anschließt, zwischen zwei für die Lösung durchlässigen Einrichtungen 3a, 3b angeordnet ist, wobei die Matrix 2 und die Einrichtungen 3a, 3b zusammen 5 bis 50% des Hohlkörpervolumens ausfüllen und die weitere Öffnung 4a des kegelstumpfförmigen Hohlkörpers 1 an eine Pipette anschließbar ist.

Die Figuren 1 und 2 zeigen schematisch den Aufbau einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Die Matrix 2 wird von zwei Einrichtungen 3a, 3b begrenzt, die gleichzeitig dafür sorgen, daß die Matrix 2 in der gewählten Position fixiert ist. Die Einrichtungen 3a, 3b werden vorzugsweise an der Wandung des Hohlkörpers 1 festgeklemt. Es kann jedoch neben der Befestigung durch Spannung auch eine Befestigung durch Festkleben der Einrichtungen erreicht werden. Beide Methoden führen zu einer hinreichenden Abdichtung zwischen den Einrichtungen 3a, 3b und der Wand des Hohlkörpers 1. Vorzugsweise findet sich zwischen der unteren Einrichtung 3b und der engeren Öffnung 4b ein freier Raum, wobei dieser freie Raum klein sein soll gegenüber dem Gesamtvolumen des Hohlkörpers. Die weitere Öffnung 4a der beiden Öffnungen 4a und 4b ist so ausgestaltet, daß sie auf eine handelsübliche Pipette passen. Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht darin, daß der Hohlkörper 1 in Form einer kommerziell im Fachhandel erhältlichen Pipettenspitze (Firma Brand, Gilson, Eppendorf) ausgestaltet ist. Die Matrix 2 der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht vorzugsweise aus einem porösen Chromatographiematerial, insbesondere auf der Basis von Silicagel, Aluminiumoxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol

oder anderen organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien. Das die Matrix 2 bildende Material kann auch ein oberflächlich modifiziertes, poröses Chromatographiematerial auf der Basis von Silicagel, Aluminiumoxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol oder anderen organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien sein.

Die Wahl des entsprechenden Chromatographiematerials ist abhängig von den jeweiligen zu trennenden und reinigenden Molekülen und dem Fachmann aufgrund der Regeln der Chromatographie bekannt. So wird beispielsweise ein polares Molekül, wenn es an der Matrix 2 adsorbiert werden soll, nur dann an der Oberfläche der Matrix 2 adsorbiert, wenn entsprechende Wechselwirkungen vorliegen, die beispielsweise ebenfalls durch polare Gruppen an der Oberfläche der Matrix 2, jedoch mit entgegengesetzter Polarität, vermittelt werden. So können beispielsweise Ionenaustauschermaterialien als Matrix 2 der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Trennung und Reinigung von polaren Molekülen eingesetzt werden. Weitere bevorzugte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung können als Matrix 2 ein Reversed-Phase- und/oder ein Affinitätschromatographiematerial beinhalten. Die Porengröße der porösen Chromatographiematerialien beträgt vorzugsweise 20 bis 1000 nm, und die Korngröße der Materialien insbesondere 10 bis 2000  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 75  $\mu\text{m}$  bis 125  $\mu\text{m}$ .

Die die Matrix 2 fixierenden Einrichtungen 3a, 3b sind vorzugsweise als poröse Fritten mit Porengrößen von 10  $\mu\text{m}$  bis 1 mm, vorzugsweise 70  $\mu\text{m}$  bis 2000  $\mu\text{m}$  ausgestaltet.

- 5 -

Die porösen Fritten können aus Kunststoffen, insbesondere aus Teflon (PTFE), Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol, Polyurethan etc. bestehen. Aber auch anorganische Werkstoffe, wie Glas und/oder gesintertes Metall sind geeignete Materialien zur Herstellung der porösen Fritten.

Die Figuren 3a und 3b zeigen eine weitere Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung, deren einfache Herstellung besonders vorteilhaft ist. In den Hohlkörper 1 wird eine entnehmbare Kartusche 5 eingesetzt, welche die Matrix 2 zwischen den die Matrix fixierenden Einrichtungen 3a und 3b enthält. Die Einrichtung 3b ist dabei über einem netzartigen Träger 6 angeordnet, der vorzugsweise aus demselben Material wie die entnehmbare Kartusche 5 besteht. In besonders vorteilhafter Weise werden der netzartige Träger 6 und die Kartusche 5 in einem Arbeitsgang produziert, beispielsweise im Spritzgußverfahren, wenn Kartuschen aus Kunststoff, insbesondere Polypropylen, hergestellt werden. Über der Matrix 2 ist die Einrichtung 3a angeordnet, auf der ihrerseits wiederum ein poröser, netzartiger Deckel 7 angeordnet ist. Dadurch wird die Anordnung in der entnehmbaren Kartusche 5, bestehend aus erster Einrichtung 3b, Matrix 2 und zweiter Einrichtung 3a, zusätzlich fixiert. Die Figur 3b zeigt die Gesamtanordnung, bestehend aus Hohlkörper 1 und entnehmbarer Kartusche 5. Diese Gesamtanordnung, bestehend aus Kartusche 5, die Matrix 2 fixierenden Einrichtungen 3a,b und Deckel 7 kann in besonders vorteilhafter Weise mit handelsüblichen Pipettenspitzen kombiniert werden. Im einfachsten Fall geschieht dies durch Hineindrücken der entnehmbaren Kartusche 5 in den entsprechenden Hohlkörper 1, insbesondere eine Pipettenspitze. Es versteht sich von selbst, daß die Kartusche 5 so dimensioniert ist, daß sie einen leichten Druck auf die Innenwände

der Pipettenspitze ausübt, um bei Aufnahme von Flüssigkeit oder einer Probe nicht hochgedrückt zu werden bzw. um die notwendige Abdichtung zur Innenwand des Hohlkörpers 1, vorzugsweise einer Pipettenspitze, und der Außenwand der entnehmbaren Kartusche 5 zu gewährleisten. Die Wandstärke der entnehmbaren Kartusche 5 des netzartigen Trägers 6 und des porösen netzartigen Deckels 7 ist auf die verwendete Pipettenspitze abgestimmt.

Der Vorteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung liegt in der praktischen Handhabung und der Art der Packung der Matrix 2, die einen Fluß der die Moleküle enthaltenden Lösung in Hin- und Rückrichtung zuläßt. Ist der kegelförmige Hohlkörper 1 beispielsweise als Pipettenspitze ausgebildet, so wird die Pipettenspitze in die Probe eingetaucht, die Probe in der Pipettenspitze durch die Matrix 2 hindurch hochgesaugt und anschließend herausgedrückt. Dadurch wird eine höhere Effizienz der Adsorption erzielt, da die Probe das Chromatographiematerial zweimal passiert. Da man mit einem geschlossenen System arbeiten kann, wird eine Kontamination der Probe oder eine Gefährdung der Umwelt vermieden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung erleichtert die Arbeitsweise insgesamt, die bei der Trennung und Reinigung von Molekülen anzuwenden ist. Insbesondere können mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung auch Biopolymere, insbesondere Nucleinsäuren und Proteine, schnell, einfach und sicher fraktioniert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in einer besonderen Ausführungsform durchgeführt mit einem als Pipettenspitze ausgestalteten Hohlkörper 1. Die die Moleküle enthaltenden, zu trennenden und reinigenden Moleküle können dann mittels einer Pipette durch die Matrix 2 befördert werden. Soll die Pipettenspitze als Säulenersatz in herkömmlichen Verfahren eingesetzt werden, so

kann mittels eines Silikonschlauches die Pipettenspitze auch mit einer Einwegspritze verbunden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist geeignet, insbesondere Biopolymere wie Nukleinsäuren und Proteine zu trennen und zu reinigen, indem als Matrix 2 Ionenaustauscherchromatographiematerialien, wie sie in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagen werden, verwendet werden. Es handelt sich dabei um mit Anionenaustauschergruppen oberflächlich modifiziertes Chromatographiematerial auf Silicagelbasis. Befindet sich beispielsweise die Matrix 2 in einer Pipettenspitze, so saugt man die Nukleinsäure mit der Pipette durch die Matrix 2. Dabei werden unter Verwendung von Puffern niedriger Ionenstärke die langkettigen Nukleinsäuren adsorbiert. Will man die kurzkettigen Nukleinsäuren anschließend verwerten, drückt man die Lösung wieder durch die Matrix 2 hindurch und fängt sie auf. Dann können weitere Verfahrensschritte folgen. Ist man jedoch an der Analyse der langkettigen Nukleinsäuren interessiert, kann man nach einigen Waschschritten die langkettigen Nukleinsäuren durch Elution mit Puffern hoher Salzkonzentration (hohe Ionenstärke) wieder eluieren und entsprechend weiterverarbeiten.

Die Figur 4 zeigt ein Elutionsprofil, das bei Verwendung von Anionenaustauschermaterialien bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung erhalten werden kann. Es zeigt sich, daß bei Verwendung des in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagenen Materials zur Trennung von Nukleinsäuren ein Elutionsprofil erhalten wird, durch das mit steigender Ionenstärke Nukleinsäuren mit steigender Kettenlänge eluierbar werden. So wird doppelsträngige DNS mit Basenpaaren > 500 erst bei einer Ionenstärke von 1,3 M Natriumchlorid erhalten, während einzelsträngige DNS des Phagen



M 13 schon bei 1,1 M Natriumchlorid eluiert wird. Die Elutionspeaks sind so scharf, daß sogar "baseline"-Trennungen möglich sind. Bei einer mittleren Ionenstärke zwischen 0,5 und 1 M Natriumchlorid eluieren Nukleinsäuren wie tRNS, 5S RNS und mRNS. Bei niedrigen Ionenstärken von 0,1 bis 0,5 werden bereits Polysaccharide, Proteine, Metaboliten, Farbstoffe, einzelne Nukleotide, Proteine wie BSA (bovine serum albumin) und kleinere Nukleotide wie beispielsweise ein Nukleotid Decamer, das als "linker" verwendet wird, eluiert.

Eine Verfahrensvariante besteht darin, als Matrix 2 ein Affinitätsadsorbens, wie es beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung P 36 27 063 vorgeschlagen wird, zu verwenden. Die Durchführung des Verfahrens erfolgt analog zur oben beschriebenen Verfahrensweise.

Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet die folgenden Vorteile, insbesondere bei molekularbiologischen Operationen:

- Durchführung von DNS-Präparationen in sogenannten "minipreps",
- Reinigung von mRNS, rRNS, viraler RNS und RNS-Transkripten,
- Reinigung von Proben, die nach Nicktranslation, Endmarkierung oder Oligonukleotid-induzierter Markierung (Oligolabeling) erhalten werden,
- Entfernung der DNS-linker in Klonierungsexperimenten,
- Reinigung von Nukleinsäuren nach Gelextraktion sowie
- schnelle Reinigung von Nukleinsäuren nach Abdaunung mit Restriktionsenzymen, Phosphatasebehandlungen, Polymerasereaktionen usw. anstelle einer zeitaufwendigen Phenolbehandlung.

Die bei Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung erhältliche Reinheit in Routinepräparationen ist zumindest mit durch Caesiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation erhaltenen Proben vergleichbar. Die isolierten Nukleinsäuren sind befreit von Proteinen, Polysacchariden und anderen Zellmetaboliten und zeigen keinerlei Inhibierung von Enzymen bei enzymatischen Reaktionen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Oligonukleotiden bis hin zu Plasmiden verwendet werden, wobei der Zeitaufwand auf Bruchteile im Vergleich zu anderen Verfahren eingeschränkt wird.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist geeignet zur Verwendung in einem Trennungs- und Reinigungsverfahren für Moleküle, vorzugsweise Biopolymere wie Proteine und/oder Nukleinsäuren, insbesondere von anderen Zellbestandteilen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in verschiedenen Verfahren wird in den folgenden Beispielen näher erläutert. Dabei wird die erfindungsgemäße Vorrichtung in einer bevorzugten Ausführungsform, der Pipettenspitze, eingesetzt.

#### Beispiel 1

In eine 1 ml Pipettenspitze, passend für Gilson Pipetman, wird eine 70 µm Polyethylen-Fritte mit 4 mm Durchmesser, Dicke 1,6 mm, eingeführt und durch Drücken festgeklemmt. Danach werden ca. 70 mg des Chromatographiematerials, vorgeschlagen in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949, trocken eingefüllt. Das Chromatographiematerial wird mit einer wie oben beschriebenen Fritte mit 5,7 mm Durchmesser verschlossen und die Fritte durch Festdrücken an ihrem Platz fixiert.

- 10 -

Analog verfährt man bei 200  $\mu$ l fassenden Pipettenspitzen bzw. 5000  $\mu$ l fassenden Pipettenspitzen.

### B e i s p i e l 2

5 Die allgemeine Handhabung der in Beispiel 1 hergestellten Pipettenspitze geschieht wie folgt:

10 Zunächst wird die Pipettenspitze einmal mit 100  $\mu$ l eines geeigneten Adsorptionspuffers äquilibriert. Bei einem zu verarbeitenden Probenvolumen von 100 bis 200  $\mu$ l reicht es aus, die Probe etwa fünfmal durch das Chromatographiematerial zu drücken. Soll jedoch eine größere Flüssigkeitsmenge verarbeitet werden, wie sie  
15 beispielsweise nach Gelelution anfällt, kann die Probe mittels eines Silikonschlauches, der die Pipettenspitze und eine Einwegspritze verbindet, durch die Matrix hindurchgezogen werden. Es ist dann ausreichend, daß die Probe nur zweimal das Chromatographiematerial passiert. Dabei sollte die Fließgeschwindigkeit der Lösung nicht  
20 höher als 1 ml pro Minute sein.

Als Äquilibrierungs- und Adsorptionspuffer kann der Puffer A verwendet werden.

25 Puffer A:  
400 mM Natriumchlorid  
15% Ethanol  
50 mM MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure)  
1 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)  
30 pH 7.0

Analog zum oben beschriebenen Adsorptionsvorgang werden die Waschschritte durchgeführt. Als Waschpuffer dienen bei Nukleinsäurepräparationen typischerweise die Puffer B, C und D.

- 11 -

## Puffer B:

750 mM Natriumchlorid  
15% Ethanol  
50 mM MOPS  
1 mM EDTA  
pH 7.0

## Puffer C:

1000 mM Natriumchlorid  
15% Ethanol  
50 mM MOPS  
1 mM EDTA  
pH 7.0

## Puffer D:

1000 mM Natriumchlorid  
50 mM MOPS  
pH 7.0

Man füllt ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Waschpuffer und spült dreimal 150 µl durch das Chromatographiematerial, um Verunreinigungen zu entfernen. Dieser Schritt wird wiederholt.

Die Elution der adsorbierten Nukleinsäuren erfolgt wie in beiden vorgangegangenen Schritten entweder mit einer Eppendorf- oder Gilson-Pipette oder mit einer Einwegspritze, wobei darauf zu achten ist, daß die Pipettenspitze mittels eines Silikonschlauches mit der Einwegspritze verbunden ist. Es wird einfach der Elutionspuffer E oder F

## Puffer E:

1100 mM Natriumchlorid  
15% Ethanol  
4 M Urea  
50 mM MOPS  
1 mM EDTA  
pH 7.0

## Puffer F:

1500 mM Natriumchlorid  
15% Ethanol  
50 mM MOPS  
1 mM EDTA  
pH 7.50

durch die Pipettenspitze gesaugt bzw. gedrückt. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Die Eluate werden vereinigt und die Nukleinsäure daraus gefällt.

B e i s p i e l 3

5 Eine Pipettenspitze, hergestellt nach Beispiel 1, wird mit 50 mM Natriumphosphatpuffer hydratisiert und äquili-  
briert, indem man 750 µl Puffer mehrmals durch die  
10 Pipette saugt. Eine Probe, die 20 µg Plasmid pBR322 DNS in 500 µl 0,5 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumphosphat, pH 7, enthält, wird an das Chromatographiematerial durch fünfmaliges Hochsaugen und Ausdrücken adsorbiert. Nicht gebundene Bestandteile und Verunreinigungen werden durch fünfmaliges Hochsaugen und Ausdrücken von jeweils 1 ml frischem 0,5 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumphosphat, pH 7, ausgewaschen. Die Plasmid-DNS wird anschließend mit 1,5 M Natriumchlorid und  
15 50 mM Natriumphosphat, pH 7, eluiert, indem man 1 ml des Elutionspuffers dreimal hochsaugt und ausdrückt.

B e i s p i e l 4

20 Eine Plasmid-DNS-Probe wird in einer sogenannten Mini-präparation typischerweise durch folgende Schritte gewonnen:

25 Die Bakterienzellen werden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wird in 85 µl einer eiskalten Lösung von 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, mit 2 mg/ml Lysozym (frisch zubereitet) aufgeschlossen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden 20 µl einer 0.5 M EDTA-Lösung hinzugefügt und  
30 weitere 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 2%-igem Triton X' 100 inkubiert man auf Eis für eine weitere Stunde. Die Probe wird in einer Laborzentrifuge 30 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, und 100 µl des von Zelltrümmern befreiten Zell-Lysates werden in ein anderes Eppendorf-Gefäß überführt, wonach 1 Volumen 2 M Natriumchlorid, 100 mM MOPS, pH 7, und 5 µl

- 13 -

Isoamylalkohol zugegeben werden. Eine erfindungsgemäße Pipettenspitze der Firma Gilson, Brand, Eppendorf, hergestellt nach Beispiel 1, wird mit 100  $\mu$ l Puffer C äquilibriert. Danach adsorbiert man 100  $\mu$ l einer E. coli-Plasmid-DNS-Probe an dem Chromatographiematerial, indem man die Probe fünfmal auf- und abpipettiert. Nach der Adsorption wird mit insgesamt 2 bis 5 ml des Puffers C gewaschen, woraufhin die Plasmid-DNS mittels 300  $\mu$ l des Puffers F eluiert wird. Anschließend fällt man die DNS mit 300  $\mu$ l Isopropanol, läßt 15 Minuten stehen und zentrifugiert dann die Probe dann in einer Eppendorf-Laborzentrifuge 30 Minuten lang.

#### B e i s p i e l 5

Die Isolierung von mRNS, rRNS und viraler RNS von Rohextrakten geschieht wie folgt:

Der RNS-Extrakt wird mit Ethanol gefällt und das erhaltene Pellet in TE-Puffer (10 mM Tris/1 mM EDTA, pH 7.5) resuspendiert. Man stellt die Adsorptionsbedingungen durch Zugabe von 0.1 Volumenteil (bezogen auf die resuspendierte Lösung) 5 M Natriumchlorid und 0,2 Volumenteile 250 mM MOPS, pH 7.0 ein. Die Pipettenspitze wird mit 1  $\mu$ l Puffer A äquilibriert. Danach wird die Probe durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren an das Chromatographiematerial adsorbiert. Man spült mit Puffer A, um Verunreinigungen zu eliminieren. Die Elution erfolgt mit 300  $\mu$ l des Puffers C. Die RNS wird durch Zugabe von 2,5 Volumenteilen Ethanol gefällt. Nach Stehenlassen bei -20°C, 30 Minuten, wird in einer Eppendorf-Zentrifuge insgesamt 30 Minuten bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Das Pellet wird vor der Weiterverarbeitung sorgfältig mit Ethanol gewaschen. Die Probe soll einen Nukleinsäuregehalt von höchstens 15  $\mu$ g haben.

B e i s p i e l 6

Reinigung von mRNS zur Synthese der entsprechenden cDNS wird wie in Beispiel 5 beschrieben durchgeführt.

5

B e i s p i e l 7

10

Nicht verbrauchte Triphosphate in Markierungsreaktionen wie Nicktranslationen, Endmarkierungen und Oligonukleotid-abhängigen Markierungen (Oligolabeling) von DNS werden wie folgt entfernt:

15

20

25

Die Markierungsreaktion der DNS wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA pro 20 µl Probenvolumen beendet, und man stellt die Adsorptionsbedingungen durch Zugabe von 1 Volumenteil des Puffers C ein. Die Gesamtsalz-Endkonzentration soll in etwa 500 mM betragen. Die Pipettenspitze gemäß der Erfindung wird mit 100 µl Puffer B äquilibriert. Die Probe wird durch fünfmaliges Hochsaugen und Ausdrücken an das Chromatographiematerial adsorbiert und insgesamt mit 10 ml des Puffers B gewaschen, um die nicht reagierten Nukleotide abzutrennen. Die Fließgeschwindigkeit des Waschpuffers soll vorzugsweise ca. 5 ml pro Minute betragen. Die markierte DNS wird anschließend mit insgesamt 300 µl des Puffers F eluiert. Die Probe kann direkt weiterverwendet werden, wenn sie mit dem zur Hybridisierung vorgesehenen Puffer mindestens 1:20 verdünnt wird. Anderenfalls wird die Probe ausgefällt und in TE-Puffer gelöst.

30

B e i s p i e l 8

Die Entfernung eines DNS-linkers von einer DNS mit mehr als ca. 400 Basenpaaren in einem Klonierungsexperiment wird wie folgt durchgeführt:

- 15 -

Die zu reinigende Probe wird mit 1 Volumenteil des Puffers C verdünnt, damit die Endkonzentration an Salz ungefähr 500 mM beträgt. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird mit 100  $\mu$ l des Puffers A äquilibriert. Die Probe wird wie in den vorhergehenden Beispielen adsorbiert. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird mit Puffer B gespült, um die Verunreinigungen zu entfernen. Die DNS wird desorbiert und eluiert mit insgesamt 300  $\mu$ l des Puffers F. Anschließend isoliert man die DNS durch Isopropanolfällung (Zugabe von 1 Volumenteil) und läßt 15 Minuten auf Eis stehen, wonach sich eine Zentrifugation der Probe in einer Eppendorf-Zentrifuge für die Dauer von 30 Minuten anschließt. Danach wäscht man sorgfältig mit 70%-igem Ethanol.

#### Beispiel 9

Die Schnellreinigung einer DNS-Probe nach enzymatischer Modifizierung (zum Beispiel durch Phosphatase, Restriktionsendonuklease, Polymerasen usw. sowie Cofaktoren) erreicht man gemäß folgender Verfahrensweise:

Das zugrunde liegende Reaktionsvolumen beträgt 50  $\mu$ l und enthält nicht mehr als 100 mM Natriumchlorid. 5  $\mu$ l 0,5 M EDTA, pH 8.0, werden zum Reaktionsvolumen hinzugefügt, um die Modifizierungsreaktion abubrechen. Ein Volumenteil des Puffers C wird zugegeben, um die Adsorptionsbedingungen einzustellen mit einer Salzkonzentration von etwa 500 mM. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird äquilibriert, die Probe wird adsorbiert und anschließend eluiert wie in Beispiel 8 beschrieben. Auch die weitere Behandlung der Probe geschieht wie in Beispiel 8 beschrieben.



Beispiel 10

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann auch dazu benutzt werden, um Agarose- und Acrylamid-Verunreinigungen effizient abzutrennen. Dies ist insbesondere dann erforderlich, wenn Gelelutionen der Probe stattgefunden haben. Bei Anwendung der im folgenden beschriebenen Verfahrensweise wird die DNS gleichzeitig konzentriert, selbst wenn das Startvolumen einige ml beträgt. Die DNS hat eine Größe von  $> 400$  Basenpaaren und kann in einer Menge von 5 ng bis 15  $\mu\text{g}$  vorliegen. Die Probenvorbereitung und die Äquilibrierung der erfindungsgemäßen Pipettenspitze wird wie in Beispiel 8 beschrieben durchgeführt. Dann überführt man die Probe in eine Einwegspritze und drückt sie zweimal durch die erfindungsgemäße Pipettenspitze. Dabei soll die Fließgeschwindigkeit bei etwa 250  $\mu\text{l}/\text{min}$  liegen. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird anschließend mit 5 ml des Puffers B gewaschen bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/min. Die Weiterbehandlung der DNS-Probe geschieht wie in Beispiel 8 beschrieben.

25

30

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Vorrichtung zur Trennung und Reinigung von Molekülen aus einer Lösung durch Adsorption der Moleküle an einer Matrix, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (2) in  
5 einem an beiden Enden (4a, 4b) offenen, kegelstumpfförmigen Hohlkörper (1), an den gegebenenfalls an der weiteren Öffnung (4a) ein zylindrischer Hohlkörper anschließt, zwischen zwei für die Lösung durchlässigen  
10 Einrichtungen (3a, 3b) angeordnet ist, wobei die Matrix (2) und die Einrichtungen (3a, 3b) zusammen 5 bis 50 % des Hohlkörpervolumens ausfüllen und die weitere Öffnung (4a) des kegelstumpfförmigen Hohlkörpers (1) an eine Pipette anschließbar ist.
- 15 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlkörper (1) eine Pipettenspitze ist.
3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtungen (3a, 3b) die Ma-  
20 trix (2) im Hohlkörper (1) fixieren.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der engeren Öffnung (4b)  
25 und der unteren Einrichtung (3b) ein freier Raum ist.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Hohlkörper (1) eine entnehmbare Kartusche (5) angeordnet ist, die die zur Trennung und Reinigung dienende Matrix (2) zwischen zwei Ein-  
30 richtungen (3a,b) fixiert, wobei die Einrichtung (3b) über einem netzartigen Träger (6) angeordnet ist, die entnehmbare Kartusche von einem porösen netzartigen Deckel (7) verschlossen ist, wobei der Deckel (7) über der Einrichtung (3a) angeordnet ist und die entnehmbare Kartusche (5) an der Innenwandung des Hohlkörpers (1) dicht abschließt.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die entnehmbare Kartusche (5), der netzartige Träger (6) und der poröse netzartige Deckel (7) aus demselben Material bestehen.
- 5 7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Material aus Kunststoffen wie Teflon (PTFE), Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol und/oder Polyuretan ist.
- 10 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix aus porösem Chromatographiematerial auf der Basis von Silicagel, Aluminiumoxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol oder anderen  
15 organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien besteht.
- 20 9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix ein oberflächlich modifiziertes Chromatographiematerial aus Silicagel, Aluminiumdioxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol oder anderen organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien ist.  
25
- 30 10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das oberflächlich modifizierte Chromatographiematerial ein Ionenaustauscher, ein Reversed-Phase- und/oder ein Affinitätschromatographiematerial ist.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Porengröße der porösen Chromatographiematerialien 20 bis 1000 nm und die Korngröße der Materialien 10 bis 2000  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 75 bis 125  $\mu\text{m}$  beträgt.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die die Matrix fixierenden Einrichtungen (3a, 3b) poröse Fritten sind mit Porengrößen von 10  $\mu\text{m}$  bis 1 mm, vorzugsweise 70 bis 200  $\mu\text{m}$ .
- 5 13. Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen aus einer Lösung durch Adsorption der Moleküle an eine Matrix mittels einer Vorrichtung, in der die die zu trennenden Moleküle enthaltende Lösung durch eine in einem Hohlkörper angeordnete Matrix hindurchgedrückt wird, 10 dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (2) von einer oberen und einer unteren Einrichtung (3a, 3b) fixiert wird und daß die Lösung durch die Matrix (2) hindurch in einen oberhalb der oberen Einrichtung (3a) vorhandenen freien Raum gesogen wird und anschließend durch die 15 Matrix (2) hindurch aus dem Hohlkörper (1) gedrückt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß Biopolymere getrennt und gereinigt werden. 20
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß Nukleinsäuren und/oder Proteine getrennt und gereinigt werden.
- 25 16. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Trennung und Reinigung von Molekülen, vorzugsweise Biopolymeren.
- 30 17. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 16 zur Trennung und Reinigung von Proteinen und/oder Nukleinsäuren.

1/5

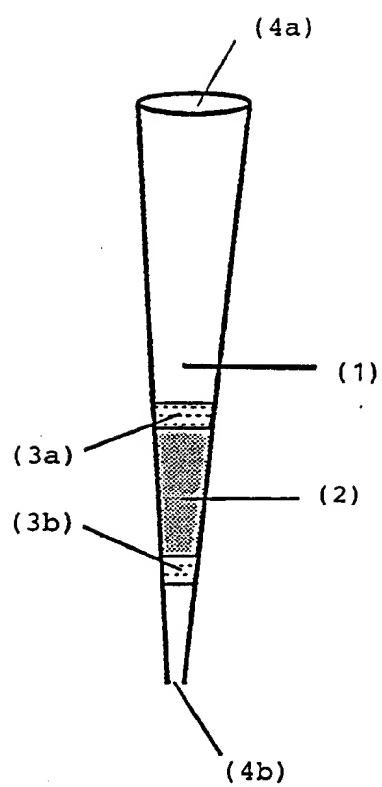


Fig. 1

2/5

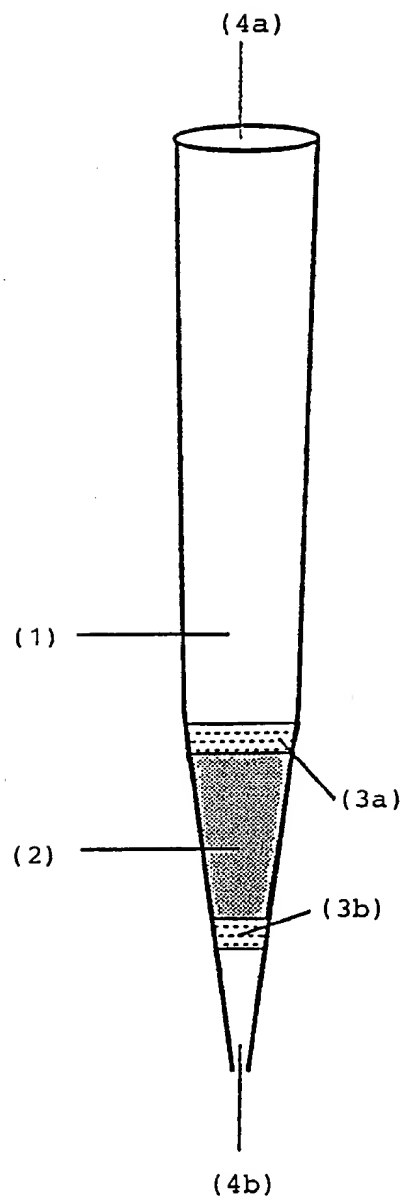


Fig. 2

3/5

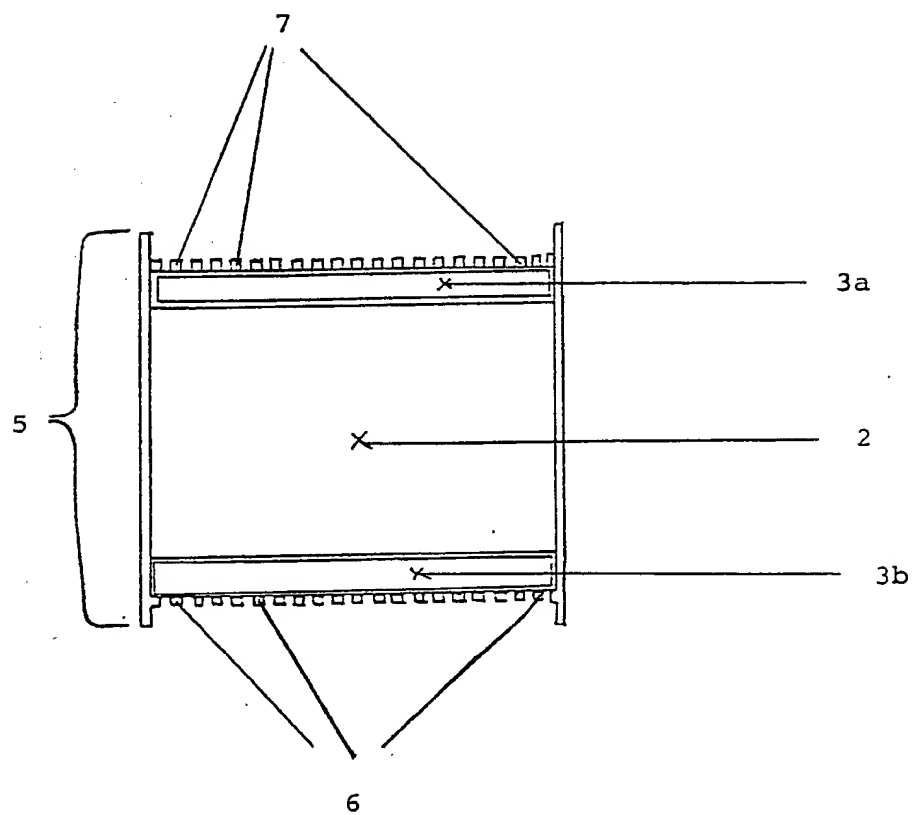


Fig. 3a

4/5

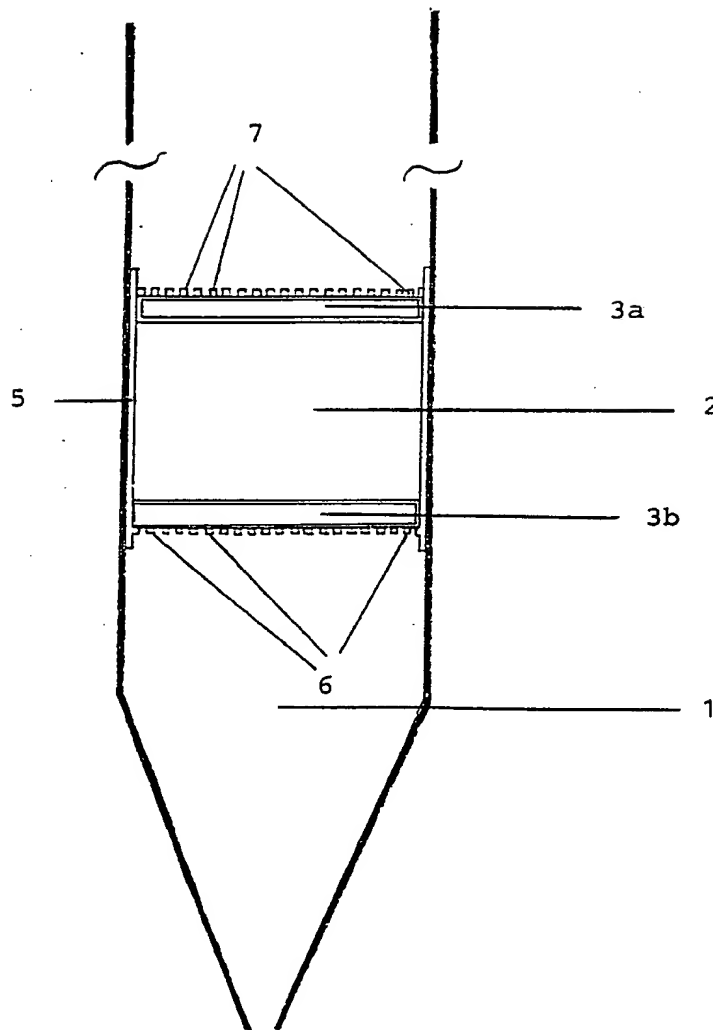


Fig. 3b



5/5

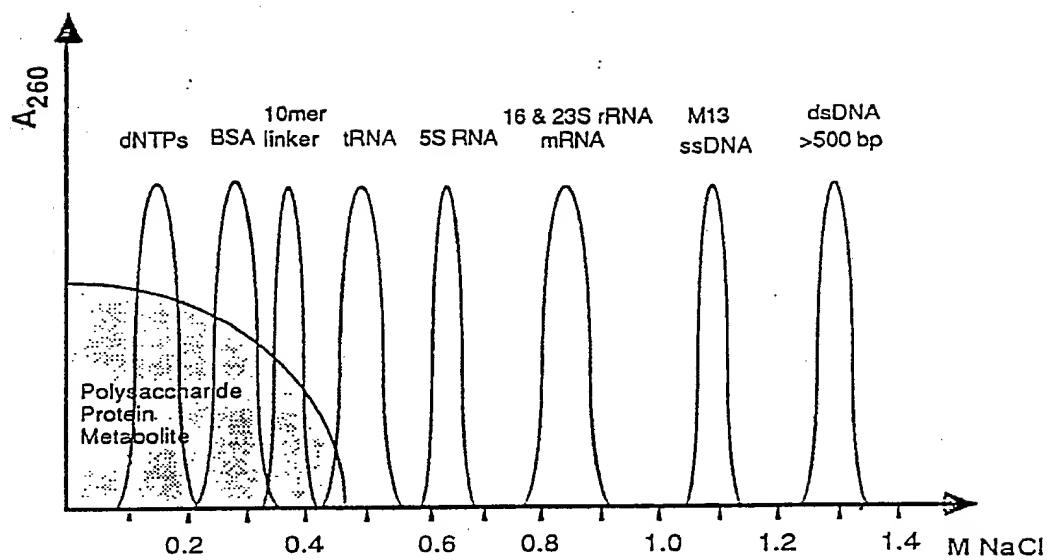


Fig. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 88/00442

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>4</sup> B 01 D 15/00; G 01 N 33/50; B 01 L 3/02		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>4</sup>	B 01 D; G 01 N; B 01 L	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	EP, A, 0198413 (DU PONT DE NEMOURS) 22 October 1986 see column 8, lines 7-34; column 12, line 1 - column 14, line 32; column 17, line 20 - column 18, line 11; column 25, lines 7-20; column 27, line 1 - column 28, line 17	1-4,8-11,13-17
A	US, A, 3985032 (AVAKIAN) 12 October 1976, see column 2 lines 27-62	1,2
A	FR, A, 2498331 (KADOUCHE) 23 July 1982, see pages 10,11	1,2,13-17
A	DE, A, 2452274 (WÜST) 06 May 1976, see pages 2-4	1,13-17
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
14 July 1988 (14.07.88)	02 September 1988 (02.09.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 8800442  
SA 22309

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 24/08/88  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0198413	22-10-86	JP-A- 61241664 US-A- 4753775	27-10-86 28-06-88
US-A- 3985032	12-10-76	Keine	
FR-A- 2498331	23-07-82	Keine	
DE-A- 2452274	06-05-76	Keine	

EPO FORM P4179

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 88/00442

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. <sup>4</sup> <b>B 01 D 15/00; G 01 N 33/50; B 01 L 3/02</b>		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem  Int. Cl. <sup>4</sup>	Klassifikationssymbole  <b>B 01 D; G 01 N; B 01 L</b>	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
<b>X</b>	EP, A, 0198413 (DU PONT DE NEMOURS) 22. Oktober 1986, siehe Spalte 8, Zeilen 7-34; Spalte 12, Zeile 1 - Spalte 14, Zeile 32; Spalte 17, Zeile 20 - Spalte 18, Zeile 11; Spalte 25, Zeilen 7-20; Spalte 27, Zeile 1 - Spalte 28, Zeile 17 --	1-4, 8-11, 13-17
<b>A</b>	US, A, 3985032 (AVAKIAN) 12. Oktober 1976, siehe Spalte 2, Zeilen 27-62 --	1, 2
<b>A</b>	FR, A, 2498331 (KADOUCHE) 23. Juli 1982, siehe Seiten 10, 11 --	1, 2, 13-17
<b>A</b>	DE, A, 2452274 (WUST) 6. Mai 1976, siehe Seiten 2-4 -----	1, 13-17
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <b>14. Juli 1988</b>		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <b>02 SEP 1988</b>
Internationale Recherchenbehörde  <b>Europäisches Patentamt</b>		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b>

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 8800442  
SA 22309

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 24/08/88.  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0198413	22-10-86	JP-A- 61241664 US-A- 4753775	27-10-86 28-06-88
US-A- 3985032	12-10-76	Keine	
FR-A- 2498331	23-07-82	Keine	
DE-A- 2452274	06-05-76	Keine	

EPO FORM 19073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82